

Редкая форма тромбоцитопатии с нарушением прокоагулянтной активности и секреции тромбоцитов

Д.М. Полохов¹, С.А. Васильев², Н.И. Зозуля², М.А. Кумскова²,
Т.Н. Моисеева², Л.С. Аль-Ради², М.А. Пантелеев^{1, 3, 4, 5}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва

³ Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, Москва

⁴ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

⁵ ФГБОУ ВПО Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва

У 54-летней женщины со склонностью к кровотечениям после оперативных вмешательств выявлены нарушения функциональной активности тромбоцитов в виде ослабления выставления фосфатидилсерина и реакции высвобождения плотных и α -гранул. Морфология тромбоцитов оставалась нормальной, так же как и агрегаторная функция при исследовании по методу Борна–О’Брайена с активацией АДФ, коллагеном и ристомисином. При исследовании плазменного звена гемостаза нарушений не выявлено. Полученные данные указывают на наличие у пациентки неклассифицированной тромбоцитопатии.

Ключевые слова: склонность к кровоточивости, дисфункция тромбоцитов, проточная цитометрия, агрегация тромбоцитов, функциональная активность тромбоцитов.

Combined disorder of procoagulant activity and platelet secretion with normal aggregation in a patient with a bleeding tendency

D.M. Polokhov¹, S.A. Vasiliev², N.I. Zozulya², M.A. Kumsikova², T.N. Moiseeva², L.S. Al-Radi², M.A. Panteleev^{1, 3, 4, 5}

¹ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

² National Medical Research Center of Hematology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

³ Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences, Moscow

⁴ Lomonosov Moscow State University Lomonosov Moscow

⁵ Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow

A 54-year-old woman with a bleeding tendency after surgical interventions revealed abnormalities in the functional activity of platelets in the form of decreased phosphatidylserine exposure and the release of dense and α -granules. The morphology of the platelets remained normal, as was the aggregation function in the Born-O'Brien method with activation of ADP, collagen and ristomycin. In the study of plasma hemostasis, there were no abnormalities. The findings indicate that the patient has an unclassified thrombocytopathy.

Key words: bleeding tendency; dysfunction of platelets; flow cytometry; aggregation of platelets; platelet functional activity.

Контактная информация:

Пантелеев Михаил Александрович, д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. лабораторией клеточного гемостаза и тромбоза НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.

Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
Тел.: 8 (495) 287-6570, доб. 6932
E-mail: mapanteleev@yandex.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-93-96

Correspondence:

Mikhail A. Panteleev, PhD, DSc, Head of the Laboratory of cellular hemostasis and thrombosis of Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation.
Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
Tel.: +7 (495) 287-6570, ext. 6932
E-mail: mapanteleev@yandex.ru

Наиболее часто встречающиеся наследственные нарушения функции тромбоцитов описаны в литературе. Для классификации большинства из них удобно использовать выявленные генетически детерминированные основы патогенеза дисфункции мембранных рецепторов или внутриклеточных компонентов. Так, врожденный дефицит плотных гранул наблюдается при синдромах Германского–Пудлака, Чедиака–Хигаши, изолированном дефиците плотных гранул; дефицит альфа-гранул

сопровождает синдром серых тромбоцитов и Квебекский синдром; нарушением прокоагулянтных свойств характеризуется синдром Скотта [1].

В последние годы в связи с внедрением в лабораторную диагностику тромбоцитопатий метода проточной цитометрии у многих пациентов выявляют нарушения пула хранения (НПХ) и выставления фосфатидилсерина (ФС). Причем эти расстройства наблюдаются как сочетанно, так и по отдельности, могут быть врожденными и приобретенными [2–4].

Таблица
Лабораторные характеристики гемостаза пациентки

Тест	Условия проведения исследования	Референс	Результат
Агрегация			
АДФ		50–80	73
Коллаген		50–80	74
Ристоцетин		55–80	75
Функциональная активность тромбоцитов (ФАТ)			
CD42b	Неактив.	74–126	99
	Актив.	37–80	73
CD61	Неактив.	66–134	98
	Актив.	189–335	195
PAC-1	Неактив.	< 6,0	3,9
	Актив.	58–142	58
Плотные гранулы	Неактив.	73–127	89
	Актив.	14–34	69
Степень дегрануляции		2,6–5,9	1,3
Объем секреции		50–100	20
CD62p	Неактив.	< 6,4	3,6
	Актив.	72–128	45
Фосфатидил серин	Неактив.	< 2,22	0,27
	Актив.	5,5–37,7	1,2
Коагулограмма			
АЧТВ		25–37	27
ПИ		80–132	100
ТВ		12–19	15
Фг		2–4,5	3,4
VWF:fvIIIb		70–144	118
ФХIII			86,4
Тромбоциты			264 тыс./мкл

Такой дефицит плотных и/или альфа-гранул, нарушение высвобождения гранул, снижение ФС не вписываются в ранее описанные генетические синдромы. Диагноз обычно основан на наличии кровоточивости из слизистых, результатах цитометрии и нарушении агрегации (отсутствие или уменьшение вторичной волны агрегации).

Приобретенные НПХ наблюдались у пациентов с хроническим миеломоноцитарным лейкозом, острым миелоидным лейкозом, ювенильным миеломоноцитарным лейкозом, полиартритом, рефрактерной анемией с бластозом (RAEB-1), анемией Фанкони, макроглобулинемией Вальденстрема, миелодиспластическим синдромом, первичным миелофиброзом, хронической иммунной тромбоцитопенией, диффузной В-крупноклеточной лимфомой, истинной полицитемией, эссенциальной тромбоцитемией, септическим шоком, семейным геморрагическим синдромом, изолированным геморрагическим синдромом, семейной тромбоцитопенией, врожденной тромбоцитопенией. Выраженность геморрагического синдрома при этих расстройствах варьирует от 1 до 8 баллов по шкале BAT-ISTH [2, 3, 5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В Гематологический научный центр Минздрава РФ обратилась пациентка 54 лет с жалобами на повышенную кровоточивость во время и после оперативных вмешательств, соответствующую 4 баллам по шкале BAT-ISTH [5]. Сопутствующая патология – образование в правой молочной железе (внутрипротоковая множественная папилома). В повседневной жизни больная не демонстрирует геморрагического синдрома по микроциркуляторному типу. Остальные органы и системы – без особенностей.

Для уточнения стратегии дальнейшего ведения пациентке проведено исследование системы гемостаза. Образец крови был доставлен в лабораторию в течение 15 мин. Пробоподготовка и анализ заняли 1 час. Кровь забирали из вены в 5-миллиметровую цитратную вакуумную пробирку (*S-Monovette*).

Оценку функциональной активности тромбоцитов (ФАТ) проводили методом проточной цитометрии [6]. При цитометрическом исследовании оценивали изменение маркерного состава тромбоцитов в покое и после активации смесью TRAP (аналог тромбина, агонист PAR 1-рецептора) и CRP (аналог коллагена, агонист гликопротеина VI). Использовали флуоресцентно меченные маркеры: аннексин V, антитела против P-селектина, интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$, гликопротеина I, антитело PAC1 (*Biologend, San Diego, CA, USA*). Для детекции функции плотных гранул клетки нагружали мепакрином.

Исследование агрегационной функции тромбоцитов в обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП) проводилось по Борну на агрегометре «Биола» (НПФ «Биола», Москва). Использовались индукторы АДФ, коллаген, ристомидин (НПО «Ренам», Россия). Кривые агрегации регистрировали в течение 10 мин. Для плазменного звена выполнена коагулограмма (АЧТВ, ПВ, ТВ, Фг, ФВаг и активность).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У пациентки наблюдались нормальный размер, морфология и количество тромбоцитов. В гемограмме патологических изменений не выявлено: гемоглобин – 129 г/л; эритроциты – 4,7 млн/мкл; тромбоциты – 264 тыс./мкл; лейкоциты – 6,92 тыс./мкл; СОЭ – 9 мм/ч; лимфоциты – 54%; моноциты – 5%.

При изучении работы плазменного звена гемостаза нарушения не отмечены: АЧТВ – 27 сек (норма – 25–37 сек); протромбиновый индекс – 100% (норма – 80–132%); тромбиновое время – 15 сек (норма – 12–19 сек); фибриноген – 3,4 г/л (норма – 2–4,5 г/л); фактор XIII – 86,4%. Концентрация и размеры мультимеров фактора Виллебранда – в норме. Фактор VIII связывающая способность фактора Виллебранда (VWF:fvIIIb) – 118 (норма – 70–144).

При проведении оптической агрегатометрии тромбоцитов по Борну–О’Брайену (табл.) у пациентки наблюдался нормальный функциональный ответ: с АДФ – 73% (норма – 50–80%); с коллагеном – 74% (норма – 50–80%); с ристомидином – 75% (норма – 55–80%). Нарушения второй волны агрегации не наблюдались.

Методом ФАТ показано снижение в 4,5 раза доли прокоагулянтных тромбоцитов (табл.), характеризующееся ослаблением экспонирования ФС на поверхность цитоплазматической мембраны после активации (1,2% от общего количества клеток; норма – 5,5–37,7%).

Количество плотных гранул (оценивали по накоплению мепакрина) было нормальным, однако при активации тромбоцитов выброс плотных гранул снизился до 20% (норма – 50–100%). Наблюдалось также снижение количества Р-селектина (CD62p) на мембране активированных тромбоцитов (45% при норме 72–128%), что указывает на нарушение экзоцитоза альфа-гранул. Интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ (ГП IIb/IIIa, активированный CD61, меченый антителом PAC1) был на нижней границе нормы – 58% (норма – 58–142%).

Количество ГП Ib и IIb/IIIa находилось в референсном диапазоне.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

При проведении функциональных исследований тромбоцитарного звена гемостаза у пациентки наблюдалась картина дисфункции тромбоцитов, определяющая повышенную кровоточивость после оперативных вмешательств.

Значимый вклад в развитие клинической картины может вносить выраженное снижение количества тромбоцитов, предоставляющих фосфолипидную (ФЛ) поверхность. Отрицательно заряженные ФЛ необходимы для Ca^{2+} -зависимых взаимодействий компонентов теназного и протромбиназного коагуляционных комплексов с клеточной поверхностью. Возможно, имеет место наследственный дефект ферментов, обеспечивающих транспорт ФЛ между внутренней и наружной сторонами плазматической мембраны, таким образом угнетается работа коагуляционного каскада, как при синдроме Скотта [7].

Возможной причиной угнетения «реакции высвобождения» и экзоцитоза α -гранул может стать нарушение в работе путей, передающих активационные сигналы от рецепторов тромбина и коллагена [8].

Для профилактики кровотечений перед оперативным вмешательством пациентке были рекомендованы гемостатические препараты – Этамзилат и транексамовая кислота (антифибринолитик); в случае выраженной кровоточивости интраоперационно – препарат активированного фактора VII, трансфузия тромбоконцентрата; при кровоточивости после операции – Этамзилат и транексамовая кислота до полного восстановления гемостаза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наблюдаемая картина дисфункции тромбоцитов при нормальном их количестве, морфологии и агрегаторном ответе при активации АДФ коллагеном и ристомидином, но выраженным угнетением выставлении ФС и НПХ создает клинко-лабораторную картину неклассифицированной тромбоцитопатии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом эндаунтмент-фонда «Врачи, инновации, наука – детям» и грантом Президента РФ для молодых ученых МД-229.2017.4.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Д.М. Полохов <http://orcid.org/0000-0001-6905-2878>

М.А. Кумскова <http://orcid.org/0000-0002-2477-3011>

М.А. Пантелеев <http://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература

1. Rao A.K. Inherited Platelet Function Disorders. Overview and Disorders of Granules, Secretion, and Signal Transduction. *Hematol Oncol Clin N Am* 2013; 27: 585–611.
2. Selle F., et al. Clinical and Laboratory Findings in Patients with δ -Storage Pool Disease: A Case Series. *Seminars in Thrombosis & Hemostasis*.
3. Cai H., Mullier F., Frotscher B., Briquel M.E., Toussaint M., Massin F., et al. Usefulness of Flow Cytometric Mepacrine Uptake/Release Combined with CD63 Assay in Diagnosis of Patients with Suspected Platelet Dense Granule Disorder *Semin Thromb Hemost* 2016; 42: 282–91.
4. Daskalakis M., Colucci G., Keller P., Rochat S., Silzle T., Biasiutti F.D., et al. Decreased Generation of Procoagulant Platelets Detected by Flow Cytometric Analysis in Patients with Bleeding Diathesis. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 00B:00–00. 2014.
5. Rodeghiero F., Tosetto A., Abshire T., Arnold D.M., Collier B., James P., Neuner C., Lillicrap D. ISTH/SSC joint VWF and Perinatal/Pediatric Hemostasis Subcommittees Working Group. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2063–5.
6. Suntsova E.V., Demina I.M., Ignatova A.A., Ershov N.M., Trubina N.M., Dobrynina J., Serkova I.V., et al. Bleeding tendency and platelet function during treatment with romiplostim in children with severe immune thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2017; 105 (6): 841–8.
7. van Geffen J.P., Swieringa F., Heemskerk J.W.M. Platelets and coagulation in thrombus formation: aberrations in the Scott syndrome. *Thrombosis Research* 141S2, 2016; S12–S16.
8. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. – М.: Литтерра, 2011.